

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2003-183298

(43)Date of publication of application : 03.07.2003

(51)Int.Cl.

C07K 1/02

(21)Application number : 2001-385493

(71)Applicant : JAPAN SCIENCE &  
TECHNOLOGY CORP

(22)Date of filing : 19.12.2001

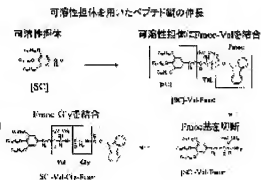
(72)Inventor : CHIBA KAZUHIRO  
KONO YUUKAI

(54) METHOD OF LIQUID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS BY SEQUENTIALLY ADDING AMINO ACID BY COMPATIBLE-MULTIPHASE ORGANIC SOLVENT SYSTEM

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method of liquid phase peptide synthesis substitutable for a solid phase peptide synthesis.

SOLUTION: The peptide is synthesized by using a solvent system the state of which is reversibly controlled between a compatible state and a phase separation state by controlling the temperature. A carrier increasing the solubility of an amino acid residue to be introduced in one solvent A constituting the solvent system is used, and a peptide-starting compound obtained by bonding an amino acid residue at the C-terminus of a peptide to be synthesized to the carrier, and amino acids are introduced in order. The other solvent B preferentially dissolves various kinds of amino acids used for the elongation of the peptide chain at a temperature not higher than the compatible state-forming temperature, and dissolves the peptide-starting compound at a temperature higher than the compatible state-forming temperature by forming the compatible state with the solvent A. The solvent B dissolving various kinds of protected amino acids is substituted with the one dissolving the amino acid for synthesizing the designed peptide in the phase separation state, and the substituted product is heated to bond the amino acid one by one.





\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

## DETAILED DESCRIPTION

---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]This invention Oligomers or polymers, such as peptide, protein, DNA, RNA, and polysaccharide, It is made to join together in the order by which one kind or two or more kinds of unit molecules which constitute these especially for peptide, especially amino acid were controlled, and is related with the synthetic method of said oligomer or polymer, especially a liquid phase peptide synthesis method. It is related with the liquid phase peptide synthesis method using a solvent system with easy control of composition of oligomer or polymer designed especially, especially peptide, and easy recovery of a resultant.

[0002]

[Description of the Prior Art]If a reagent, a catalyst, a reaction adjuvant, a by-product, etc. and the output made into the purpose are easily separable in a chemical reaction, It can control being able to lessen the drugs used at a process and making environment it not only to reduce separating operation substantially, but generate an obnoxious waste as much as possible. By the way, in it, changing two or more unit compounds one by one according to a design, it makes join together and elongates and oligomers and polymers, such as peptide and DNA, are compounded until now. As for the case of the functional group in which oligomer and polymer which should be compounded to a solid surface are made to form, for example, peptide, the solid-phase-synthesis method which compounds peptide where what introduced the amino acid residue of the carboxy terminus of peptide into the insoluble resin surface is distributed in a solvent was used for this composition. However, in this system of reaction, in order to have to perform a chemical reaction by a solid surface, a reagent cannot approach a solid surface easily and, generally reactivity and reaction velocity are low. There was a problem that it could not check simple that the reaction of the purpose has advanced. In solid phase synthesis, while it was difficult to enlarge a reaction scale, there was much what has a

high price of a solid phase carrier, and there was a problem also in respect of economical efficiency.

[0003]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]Therefore, this invention technical problem is establishing the solution peptide synthesis method for realizing separation of the acquired resultant very easily, making the solid phase surface reaction of said conventional technology into liquid phase reaction. While inquiring wholeheartedly that said problem should be solved, it considered establishing the method of compounding peptide using the solvent system which this invention persons developed until now and which can control a state for temperature by control \*\*\*\*\* reversibly in the state of compatibility, and the state of phase separation. The function which supports the peptide chain which has a bond part of the amino acid unit which starts formation of peptide in the conventional solid-phase-reaction peptide synthesis method for that purpose, was made to combine an amino acid unit one by one, and was expanded, It is necessary to find out compound residue with the function to dissolve the compound which the compound which has a bond part of the amino acid unit before the synthetic start of said peptide, and the peptide chain under composition combined in one solvent or mixed solvent system. On these specifications, a carrier is called from the technical characteristic required of this compound residue. And what consists of a nonpolar organic solvent is used as one solvent or mixed solvent A, The liquid phase peptide synthesis method system taught by said solid-phase-reaction peptide synthesis method by using the compound of said general formula A as a carrier used combining the solvent system which consists of polar organic solvents as the solvent or the mixed solvent B of another side combined with said A is established, Said technical problem was able to be solved.

[0004]

[Means for Solving the Problem]In a method of compounding peptide using a solvent system with which this invention can control a state for temperature by control \*\*\*\*\* reversibly in a state of compatibility, and the state of phase separation, As residue which introduces amino acid residue of a carboxy terminus of peptide which should be compounded, From a compound in which while a solvent system which can control said state is constituted raises solubility to a solvent or the mixed solvent A, using a carrier derived with combination of this solvent or the mixed solvent A, and this carrier. Solubility to this solvent or the mixed solvent A is raised for a compound which introduced amino acid into a peptide start compound which combined with a carrier amino acid residue of a carboxy terminus of this peptide which should be compounded, and said peptide start compound one by one, and elongated a peptide chain, As a solvent or the mixed solvent B of another side combined with this solvent or the mixed solvent A, Various amino acid used for extension of said peptide chain below at temperature which forms a state of said compatibility is dissolved preferentially, Said B which dissolved

protection amino acid which combined a protective group with various alpha position amino groups using what forms a solvent of said A and a compatibility state above temperature which forms a state of said compatibility, and dissolves said peptide start compound, It is a liquid phase peptide synthesis method combining said amino acid one by one by replacing by what dissolved amino acid which compounds peptide designed one by one in a state of phase separation, and heating to temperature which presents an after-substitution compatibility state. It is said liquid phase peptide synthesis method, wherein one solvent or mixed solvent A consists of organic solvents and a solvent or the mixed solvent B of another side combined with this solvent or the mixed solvent A consists of organic solvents preferably, An organic solvent which constitutes one solvent or mixed solvent A consists of a compound of a cycloalkane series more preferably, An organic solvent which constitutes a solvent or the mixed solvent B of another side combined with an organic solvent which constitutes this solvent or the mixed solvent A Nitroalkane, It is said liquid phase peptide synthesis method characterized by a thing as which it is chosen from a group which consists of nitril, alcohol, alkyl halide, an amide compound, and Sulh sulfo- KISAIDO, and which comprises a kind at least, A carbon number of an alkyl group of nitroalkane is 1, 2, or 3 much more preferably, A carbon number of an alkyl group of nitril is 1, 2, or 3, and the sum total of an amide compound of a carbon number of an alkyl group of N-dialkyl or N-monoalkyl amide and an acyl group, or a formyl group is six or less, Carbon number of alcohol is eight or less, and a carbon number of an alkyl group of sulfo- KISAIDO is 1, 2, or 3, An alkyl group of HAHAROGEN-ized alkyl is it said liquid phase peptide synthesis method by which it is characterized that a carbon number is six or less, and much more preferably, A carrier which forms a peptide start compound, It is each aforementioned liquid phase peptide synthesis method consisting of residue from aromatic hydrocarbon rings expressed with said general formula A being what has a functional group combined with a parent cycloalkane series solvent portion and amino acid, or a basic skeleton compound of a with a carbon numbers of ten or more hydrocarbon group, It is said liquid phase peptide synthesis method being what preferably expressed with said compound group B.

[0005]In the conventional solid-phase-reaction peptide synthesis method, since amino acid bond groups existed in solid phase, reactivity with amino acid was bad, and there was a problem that a reaction in a solid surface had to be completed, by supplying amino acid of a large excessive amount to the system of reaction. However, in a liquid phase peptide synthesis method of this invention, since a reaction of peptide synthesis advances by a homogeneous solution system of a compatible state, its reaction efficiency is very high, and an excessive quantity of quantity of an amino acid molecule for making it add and react from the outside to amino acid bond groups combined with a carrier is not needed.

[0006]

[A mode of operation of this invention] This invention is explained more to details.

A. At least a solvent system of this invention by few temperature changes. Two or more sorts of single organic solvents or mixed organic solvents which can take reversibly a state of a uniform compatible mixed solvent system and a state of a separation solvent system divided into two or more phases are comprised, And although one organic solvent or mixed organic solvent dissolves a compound which combined a peptide chain which was made to combine amino acid with a peptide start compound and this one by one in a state of a separation solvent system, and was elongated, Although said amino acid to combine is not dissolved but an organic solvent or a mixed organic solvent of another side dissolves said amino acid to combine in a state of a separation solvent system, It is foundations to have the characteristic of not dissolving a compound which combined a peptide chain which was made combining amino acid with said peptide start compound and this one by one, and was elongated.

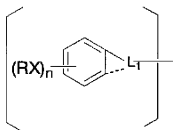
[0007]Although one [ 1 and ] single organic solvent or mixed organic solvent is chosen based on said basic characteristic, As a compound group which is a low polar organic solvent fundamentally and constitutes this solvent, An alkane, cycloalkane, an alkene, an alkyne, aromatic compounds, etc. can be mentioned, as a desirable thing, a compound of a cycloalkane series can be mentioned and cyclohexane can be especially mentioned as a desirable thing as a desirable thing. In relation to conversion of a chair type-boat conformation isomer of cyclohexane taking place on comparatively [ in temperature ] quiet conditions in connection with other solvents, it can be surmised that a solvent system of said this invention is realized. Cyclohexane has the advantage that the melting point is comparatively as high as 6.5 \*\*, and output after a reaction, etc. are solidified and it can dissociate, and can be said to be a desirable solvent also from this field.

[0008]Although chosen based on said basic characteristic like 1 as a single organic solvent or a mixed organic solvent combined with 2 and said 1, fundamentally, it is a high polar organic solvent. Preferably, it is chosen from a group which consists of nitroalkane, nitril, alcohol, alkyl halide, an amide compound, and sulfo- KISAIDO.

[0009]Being established a liquid phase peptide synthesis method of this invention combining 3 and said solvent system to a peptide start compound. In a state of a separation solvent system, solubility is improved to one single organic solvent or mixed organic solvent, It is important to choose what is not dissolved in a single organic solvent or a mixed organic solvent of another side combined with said one single organic solvent or mixed organic solvent, It is chosen from residue expressed with the following general formula A as such a thing, and residue from a basic skeleton compound of a with a carbon numbers of ten or more hydrocarbon group.

[0010]

[Formula 4]



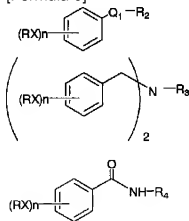
一般式 A

[0011]The hydroxyl group, thiol group which  $L_1$  combines with amino acid in the general formula A, The single bond, this hydroxyl group, thiol group which are combined with an amino group or a carbonyl group, They are an atom group who combines with an amino group or a carbonyl group, or an atom group who combines with a dotted line and forms the fused aromatic ring of two rings, A dotted line is an atom group who combines with the combination with H, or said  $L_1$ , and forms said fused aromatic ring, and X is O, S, N, an ester group, a sulfide group, or an imino group, and R, It is a with a carbon numbers of ten or more which may contain O, S, or N which improves the solubility to the solvent of a cycloalkane series as a joint atom hydrocarbon group. n is an integer of 1-5.

[0012]As an example of said general formula A, a compound of the following general formula group B can be mentioned.

[0013]

[Formula 5]

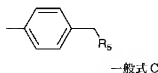


化合物群 B

[0014]In each general formula, X, R, and n are the same as the general formula A. Q is a single bond or a hydrocarbon group,  $R_2$  is the hydroxyl group, the thiol group, amino group, or carbonyl group combined with amino acid, and  $R_3$  and  $R_4$  are the bases of the following general formula C.

[0015]

[Formula 6]



[0016]  $R_5$  is the hydroxyl group, the thiol group, amino group, or carbonyl group combined with amino acid.

[0017] The amino acid used for 4 and the liquid phase peptide synthesis method of this invention, The protection amino acid used for the conventional solid-phase-reaction peptide synthesis method, for example, Fmoc(9-fluorenyl carbomethoxy)-amino acid, Boc(t-butoxycarbonyl)-amino acid, Cbz(benzyloxycarbonyl)-amino acid, etc. can be used.

[0018] Here, although a still more concrete example is shown as an example, this is for making this invention easier to understand, and does not limit this invention.

[0019] Example 1 soluble carrier [SC] - Valine (Val)-glycine (Gly)-phenylalanine (Phe)-Fmoc Liquid phase composition of [(SC)-Val-Gly-Phe-Fmoc].

Soluble carrier [SC] A methan-(3,4,5-TORIOKUTA decyloxy phenyl) 1-oar whose n R is  $C_{18}H_{37}$ , X is O and is 3, whose Q it carries out and is  $CH_2$  in the general formula group B and whose  $R_2$  is OH, [(3, 4, 5-trioctadecyloxyphenyl) methan-1-ol] is used.

[0020] Process 1 Fmoc-Val (170 mg) is dissolved in dichloromethane 3mL, and 125 mg of dicyclohexylcarbodiimide (DCC) is added further. Filtration after agitating this solution for 15 minutes at a room temperature. After carrying out concentration hardening by drying of the filtrate by a rotating evaporator, obtained residue is dissolved in dimethylformamide (DMF) 3mL. Then, a soluble carrier Cyclohexane solution (50 mg of soluble carrier / 3mL) 3mL which dissolved [SC] is added in a DMF solution. 6.5 mg of 4-dimethylaminopyridine (DMAP) is added to be carried out, a reaction solution is warmed at 50 \*\*, and a reaction is performed for 30 minutes. A solution system divided into a cyclohexane layer and a DMF layer at this time turns into a homogeneous solution system. A reaction solution is returned to a room temperature after ending reaction, and a reaction solution is made to divide into a two phase again. A lower layer DMF phase is separated and removed, 3mL addition of 10% diethylamine / the DMF solution is carried out, and it stirs for 20 minutes at 50 \*\*. Reaction mixture is cooled and a cyclohexane layer is separated. In this cyclohexane layer, it is soluble carrier joint valine  $NH_2$ . [SC] - Val- $NH_2$  is collected. (95% of yield)

[0021] Process 2 Fmoc-Gly 57mg, HOBt 55mg, and 25 mg of diisopropylcarbodiimides (DIPCD) are dissolved in DMF 2mL, and it stirs at a room temperature for 150 minutes. It uses as a Fmoc-glycine OH/DMF solution which activated this solution. That is, this solution 2mL was



obtained at the process 1 after cooling at 5 \*\*. [SC] - Add Val-NH<sub>2</sub> / cyclohexane solution (2mL). Reaction mixture is quietly raised over 1 hour from 5 \*\* to 50 \*\*, and is neglected at 50 more \*\* for 30 minutes. Since it will finally separate into two-layer again if reaction mixture is cooled to a room temperature, it is the output of the upper layer (cyclohexane layer) to the purpose. [SC] - Separate Val-Gly-Fmoc. By adding diethylamine in the solution, it is desorbed from a Fmoc basis. [SC] - Obtain Val-Gly-NH<sub>2</sub>. An outline of this synthetic reaction is shown in drawing 1.

[0022]Fmoc-Phe57mg, HOBT55mg, and 25 mg of diisopropylcarbodiimides (DIPCD) are dissolved in ranking next process 3 at DMF 2mL, and it stirs at a room temperature for 150 minutes. It uses as a Fmoc-phenyl ARANI (Phe)-OH/DMF solution which activated this solution. That is, this solution 2 ml was obtained by the cooling post process 2 at 5 \*\*. [SC] - Add Val-Gly-NH<sub>2</sub> / cyclohexane solution (2mL). Reaction mixture is quietly raised over 1 hour from 5 \*\* to 50 \*\*, and is neglected at 50 more \*\* for 30 minutes. Since it will finally separate into two-layer again if reaction mixture is cooled to a room temperature, it is the output of the upper layer (cyclohexane layer) to the purpose. [SC] - Separate Val-Gly-Phe-Fmoc. By repeating the above operation, amino acid is combined with a soluble carrier one by one, and the target oligopeptide is compounded.

[0023]Structure check [SC] Cyclohexane soluble carrier; (3,4,5-TORIOKUTA decyloxy phenyl) methan-1-oar[(3,4,5-trioctadecyloxyphenyl) methan-1-ol] .

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) delta; 5.54 (2H, s), 4.58 (2H, d, J= 5.1 Hz), 3.96 (4H, t, J= 6.6 Hz), 3.96 (3H, s), 1.82-1.70 (6H, m), and 1.50-1.41 (6H.) m), 1.38-1.20 (84H, br), 0.88. (9H, 6 or 8 Hz), <sup>13</sup>C-NMR. (100 Hz); (100MHz delta:153.2,137.4,136.0,105.2, 73.4, 69.1, 65.7, 32.0, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 26.2, 22.8 and 14.2, and; --) [ MALDI TOF-MS (pos) and ] A calculated value over C<sub>61</sub>H<sub>116</sub>O<sub>4</sub>[M+Na] <sup>+</sup>935, the experimental value 935. [0024][SC] - Val-Fmoc; <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) delta 7.76 (2H) d, J= 7.7 Hz, and 7.60 (2H, d, J= 7.7 Hz) and 7.40 (2H.) dt, J = 2.6 or 7.3 Hz, 7.31 (2H, t, J= 7.3 Hz), 6.53 (2H, s), 5.31 (1H, d, J= 9.2 Hz), and 5.11 (1H.) d, J= 12.1 Hz, 5.05 (1H, d, J= 12.1 Hz), 4.38 (2H, m), 4.23 (1H, t, J= 7.3 Hz), and 3.94 (6H.) m), and 2.19 (1H, m), 1.78 (4H, m) and 1.73 (2H.) m), 1.45 (6H, m), 1.35-1.23 (84H, br.), 0.95 (3H, d, J= 7.0 Hz), 0.88 (12H, m), ; <sup>13</sup>C-NMR. delta 172.0, 156.2, 153.2, 143.9, 143.8, 141.3, 138.4, 130.2, 128, 3, 127.7, 127.1, 125.1, 120.0, 107.1, 73.4, 69.2, 67.4, 67.1, 59.0 (CDCl<sub>3</sub>), 47.2, 32.0,

31.4, 30.3, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.1, 22.7, 14.1;TOF-MS(pos) MF, C<sub>81</sub>H<sub>135</sub>NO<sub>7</sub>[M+Na] <sup>+</sup>The calculated value 1257, the experimental value 1257 over +

[0025][SC] - Val-NH<sub>2</sub> <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) delta 6.54 (2 H): s), and 5.07 (1H, d, J= 12.1 Hz) and 503 (1H and d.) J=12.1 Hz, 3.95 (4H, t,

J=6.6 Hz), 3.94 (2H, t, J=6.6 Hz), 3.33 (2H, d, J=5.1 Hz), 2.07-2.01 (1H, m), 1.81-1.77 (4H, m), 1.76-1.71 (2H, m), 1.49-1.43 (6H, m), 1.37-1.23 (84H, br), 0.96 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.89-0.86 (12H, m),;  $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz) delta, 175.4, 153.2, 138.3, 130.7, 107.1, 73.4, 69.2, 66.8, 59.9, 32.2, 32.0, 30.3, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 26.1, 22.7, 19.3, 17.1, 14.1; TOF-MS. (pos)

$\text{C}_{66}\text{H}_{125}\text{NO}_5$  [M+Na]<sup>+</sup> The calculated value 1034, the experimental value 1034 over <sup>+</sup>[0026][SC]

- Val-Gly-Fmoc  $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) delta: 7.77 (2 H) d, J=7.3 Hz, 7.59 (2H, d, J= 7.3 Hz), 7.40 (2H, t, J= 7.3 Hz), 7.31 (2H, dt, J= 0.7, 7.3 Hz), 6.52 (2H, s), 6.38 (1H, d, J=8.4 Hz), 5.44-5.37 (1H, br), 5.10 (1H, d, J=12.1 Hz), 5.02 (1H, d, J=12.1 Hz) and 4.62 (2H --) [ dd and ] J= 8.4, 4.8 Hz, 4.42 (2H, d, J= 7.0 Hz), 4.24 (1H, t, J=7.0 Hz) and 3.96-3.92 (8H.) m), 2.21-2.16 (1H, m), 1.81-1.76 (4 H) m), 1.75-1.70 (2H, m), 1.48-1.43 (6 H) m), 1.37-1.21 (84H, br), and 0.91 (3H and d.) J=7.0 Hz, 0.88 (9H, t, J=7.0 Hz) and 0.86 (3H, d, J=7.0 Hz),;  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz) delta: 171.5, 168.7, 156.5, 153.1, 143.6, 141.2, 138.3, 130.0, 127.7, 127.0, 125.0, 120.0, 107.0, 73.4, 69.2, 67.5, 67.4, 57.1, 47.1, 32.0, 31.4, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.1, 22.8, 19.0, 17.7, 14.2,; MALDI TOF-MS(pos)  $\text{C}_{83}\text{H}_{138}\text{N}_2\text{O}_8$  [M+Na]<sup>+</sup> The calculated value 1314, the experimental value 1314 over <sup>+</sup>[0027][SC]

- Val-Gly-NH $_2$   $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) delta: 7.74 (1 H) d, J=9.2 Hz, 6.53 (2H, s), 5.11 (1 H) d, J=12.1 Hz, 5.02 (1H, d, J=12.1 Hz), 4.61 (1H, dd, J= 9.2, 5.1 Hz), 3.95 (4 H) t, J=6.6 Hz, 3.94 (2H, t, J=6.6 Hz), 3.39 (2H, s), 2.24-2.18 (1H, m), and 1.81-1.76 (4H.) m), 1.75-1.71 (2H, m), 1.49-1.44 (6 H) m), 1.37-1.20 (84H, br), and 0.93 (3H and d.) J=7.0 Hz, 0.90-0.86 (12H, m), ;  $^{13}\text{C-NMR}$ . (150.) MHzdelta: 172.6, 171.8, 153.1, 130.3, 125.5, 106.9, 73.4, 69.2, 67.2, 56.6, 44.8, 32.0, 31.3, 30.4, 30.3, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.2, 22.8, 19.1, 17.8, 14.2; MALDI TOF-MS(pos)  $\text{C}_{68}\text{H}_{128}\text{N}_2\text{O}_6$  [M+Na]<sup>+</sup> The calculated value 1091, the experimental value 1091 over <sup>+</sup>[0028][SC]

- Val-Gly-Phe-Fmoc  $^1\text{H-NMR}$  (600 MHz) delta: 7.75 (2 H) d, J=7.7 Hz, 7.53-7.49 (2H, m), 7.39 (2 H) dd, J = 7.3 or 2.2 Hz, 7.30-7.27 (4H, m), 7.25-7.21 (1H, m), 7.20-7.15 (2H, br), 6.76-6.69 (1H, br), 6.60-6.55 (1H, br), 6.50 (2H, s), 5.40-5.34 (1H, br), and 5.07 (1H.) d, J=12.1 Hz, 4.99 (1H, d, J=12.1 Hz), 4.56 (1H, dd, J= 8.8, 4.8 Hz) 4.46-4.30 (2 H) m), 4.17 (1H, t, J= 7.0 Hz), and 4.10-4.03 (1H.) m), 3.92 (6H, t, J=6.6 Hz), and 3.83-3.76 (2H.) m), 3.18-3.11 (1H, m), 3.10-3.02 (1H, m), 2.20-2.13 (1H, m), 1.79-1.69 (6H, m), 1.48-1.41 (6H, m), 1.35-1.23 (84H, br.m), and 0.91-0.85 (15H.) m);  $^{13}\text{C-NMR}$ . (150.) MHzdelta: 171.5, 171.3, 168.3, 156.0, 153, 1, 143.6, 141.2, 138.2, 136.2, 130.1, 129.1, 128.8, 127.7, 127.1, 127.0, 125.0, 124.9, 120.0, 107.0, 73.4, 69.2, 67.5, 67.1, 57.3, 47.2, 32.0, 31.3, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.2, 22.8, 19.0, 17.8, 14.2; MALDI TOF-MS(pos)  $\text{C}_{92}\text{H}_{147}\text{N}_3\text{O}_9$  [M+Na]<sup>+</sup> The calculated value 1461, the experimental value 1461 over <sup>+</sup>[0029][SC]

- Val-Gly-Phe-NH $_2$   $^1\text{H-NMR}$  (400 MHz) delta: 7.99-7.93 (1 H) m), 7.35-7.30 (2H, m), 7.27-7.21 (3 H) m), and 6.66 (1H, d, J=8.8 Hz) and

6.52 (2H, s), and 5.11 (1H, d, J= 12.1) and 5.02 (1H and d.) J= 12.1 Hz, 4.58 (1H, dd, J= 8.8, 4.8 Hz), 4.05 (1H, d, J=5.9 Hz, minor) and 4.01 (1H.) d, J=5.9 Hz, major, 3.98-3.91 (7 H m), and 3.66 (1H, d, J=10.0 Hz) and 3.32 (1H.) dd, J= 13.6, 3.9 Hz, 2.67 (1H, dd, J= 13.6, 10.0 Hz), 2.24-2.15 (1H, m), 1.82-1.69 (6H, m), 1.50-1.39 (6H, m), 1.37-1.21 (84H, br), 0.92 (3H, d, J=6.8 Hz), 0.90-0.85(12H, m); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) delta:175.2, 171.5, 168.9, 153.1, 151.4, 137.7, 129.2, 128.8, 126.9, 125.5, 107.0, 73.5, 69.2, 67.5, 57.2, 56.5, 43.4, 40.9, 32.0, 31.3, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.2, 22.8, 19.1, 17.7, and 14.2;MALDI. TOF-MS(pos)

C<sub>77</sub>H<sub>137</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>[M+Na]<sup>+</sup> The calculated value 1239, the experimental value 1239 over + [0030]Example 2

[SC] - Valine phenylalanine Fmoc [SC] Liquid phase composition Fmoc-Phe 63mg of -Val-Phe-Fmoc, HOBt 63mg, and 25 mg of diisopropylcarbodiimides (DIPCD) are dissolved in DMF2mL, and it stirs at a room temperature for 150 minutes. It uses as a Fmoc-Phe/DMF solution which activated this solution. That is, this solution 2mL was obtained at the process 1 of Example 1 after cooling at 5 \*\*. [SC] - Add Val-NH<sub>2</sub> / cyclohexane solution (2mL). Reaction mixture is quietly raised over 1 hour from 5 \*\* to 50 \*\*, and is neglected at 50 more \*\* for 30 minutes. Since it will finally separate into two-layer again if reaction mixture is cooled to a room temperature, it is the output of the upper layer (cyclohexane layer) to the purpose. [SC] - Separate Val-Phe-Fmoc. By repeating the above operation, amino acid is combined with a soluble carrier one by one, and target peptide is compounded.

[0031]Example 3 [SC] - Valine proline Fmoc [SC] Liquid phase composition Fmoc-Pro53mg of -Val-Pro-Fmoc, HOBt 57mg, and 25 mg of diisopropylcarbodiimides (DIPCD) are dissolved in DMF2mL, and it stirs at a room temperature for 150 minutes. It uses as a Fmoc-Pro-OH/DMF solution which activated this solution. That is, this solution 2 ml was obtained by 1 of Example 1 after cooling at 5 \*\*. [SC] - Add Val-NH<sub>2</sub> / cyclohexane solution (2 ml). Reaction mixture is quietly raised over 1 hour from 5 \*\* to 50 \*\*, and is neglected at 50 more \*\* for 30 minutes. Since it will finally separate into two-layer again if reaction mixture is cooled to a room temperature, it is the output of the upper layer (cyclohexane layer) to the purpose. [SC] - Separate Val-Pro-Fmoc. By repeating the above operation, amino acid is combined with a soluble carrier one by one, and target peptide is compounded.

[0032]Example 4 soluble carrier-valine alanine Fmoc [SC] - Dissolve liquid phase composition Fmoc-Ala 50mg of Val-Ala-Fmoc, HOBt53mg, and 25 mg of diisopropylcarbodiimides (DIPCD) in DMF2mL, and stir at a room temperature for 150 minutes. It uses as a Fmoc-Ala-OH/DMF solution which activated this solution. That is, this solution 2mL was obtained at the process 1 of Example 1 after cooling at 5 \*\*. [SC] - Add Val-NH<sub>2</sub> / cyclohexane solution (2 ml). Reaction mixture is quietly raised over 1 hour from 5 \*\* to 50 \*\*, and is neglected at 50 more \*\* for 30 minutes. Since it will finally separate into two-layer again if reaction mixture is cooled to a room

temperature, it is the output of the upper layer (cyclohexane layer) to the purpose. [SC] - Separate Val-Ala-Fmoc. By repeating the above operation, amino acid is combined with a soluble carrier one by one, and target peptide is compounded.

[0033]

[Effect of the Invention]As stated above, as a compound which introduced the amino acid residue of the carboxy terminus of the peptide which should be compounded by the method of this invention, By combining the compound which combined itself and peptide with the carrier which while constitutes a reactional solvent system and makes it meltable to a solvent, Compared with solid-phase-reaction peptide synthesis, the outstanding effect [ say / that the liquid phase peptide synthesis method recovery of a resultant is easy is provided easily / control ] is brought about.

---

[Translation done.]

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any  
damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

CLAIMS

---

[Claim(s)]

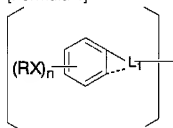
[Claim 1]As residue which is the method of compounding peptide using a solvent system which can control a state reversibly, and introduces into a state of compatibility, and a state of phase separation amino acid residue of a carboxy terminus of peptide which should be compounded by controlling temperature, From a compound in which while a solvent system which can control said state is constituted raises solubility to a solvent or the mixed solvent A, using combination with a carrier derived with combination of this solvent or the mixed solvent A, and this carrier. Solubility to this solvent or the mixed solvent A is raised for a compound which introduced amino acid into a peptide start compound which combined with a carrier amino acid residue of a carboxy terminus of this peptide which should be compounded, and said peptide start compound one by one, and elongated a peptide chain, As a solvent or the mixed solvent B of another side combined with this solvent or the mixed solvent A, Various amino acid used for extension of said peptide chain below at temperature which forms a state of said compatibility is dissolved preferentially, Said B which dissolved protection amino acid which combined a protective group with various alpha position amino groups using what forms a solvent of said A and a compatibility state above temperature which forms a state of said compatibility, and dissolves said peptide start compound, A liquid phase peptide synthesis method combining said amino acid one by one by replacing by what dissolved amino acid which compounds peptide designed one by one in a state of phase separation, and heating to temperature which presents an after-substitution compatibility-like object.

[Claim 2]The liquid phase peptide synthesis method according to claim 1, wherein one solvent or mixed solvent A consists of organic solvents and a solvent or the mixed solvent B of another side combined with this solvent or the mixed solvent A consists of organic solvents.

[Claim 3]An organic solvent which constitutes one solvent or mixed solvent A consists of a compound of a cycloalkane series, An organic solvent which constitutes a solvent or the mixed

solvent B of another side combined with an organic solvent which constitutes this solvent or the mixed solvent A Nitroalkane, The liquid phase peptide synthesis method according to claim 2 characterized by a thing as which it is chosen from a group which consists of nitril, alcohol, alkyl halide, an amide compound, and sulfo- KISAIDO, and which comprises a kind at least. [Claim 4]A carbon number is 1, 2, or 3, and a carbon number of an alkyl group of nitril of an alkyl group of nitroalkane is 1, 2, or 3, The sum total of an amide compound of a carbon number of an alkyl group of N-dialkyl or N-monoalkyl amide and an acyl group, or a formyl group is six or less, The liquid phase peptide synthesis method according to claim 3, wherein carbon number of alcohol is eight or less, and a carbon number of an alkyl group of sulfo-KISAIDO is 1, 2, or 3 and a carbon number of an alkyl group of alkyl halide is six or less. [Claim 5]A carrier which forms a peptide start compound, It is what has a functional group combined with a parent cycloalkane series solvent portion and amino acid. The liquid phase peptide synthesis method according to any one of claims 1 to 4 consisting of residue from aromatic hydrocarbon rings expressed with the following general formula A characterized by a certain thing, or a basic skeleton compound of a with a carbon numbers of ten or more hydrocarbon group.

[Formula 1]

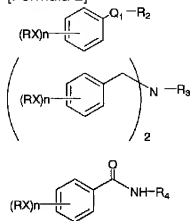


一般式 A

[The hydroxyl group which  $L_1$  combines with amino acid in the general formula A, The single bond, this hydroxyl group which are combined with a thiol group, an amino group, or a carbonyl group, They are an atom group who combines with a thiol group, an amino group, or a carbonyl group, or an atom group who combines with a dotted line and forms the fused aromatic ring of two rings, A dotted line is an atom group who combines with the combination with H, or said  $L_1$ , and forms said fused aromatic ring, and X is O, S, N, an ester group, a sulfide group, or an imino group, and R, It is a with a carbon numbers of ten or more which may contain O, S, or N which improves the solubility to the solvent of a cycloalkane series as a joint atom hydrocarbon group. n is an integer of 1-5. ]When a with a carbon numbers [ said ] of ten or more hydrocarbon group is what improves the solubility to a parent cycloalkane series solvent, it has the branched chain and/or substituent which have a functional group combined with said amino acid.

[Claim 6]The liquid phase peptide synthesis method according to claim 5, wherein a compound expressed with the general formula A is what is chosen from the following general formula group B.

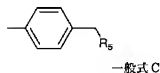
[Formula 2]



化合物群B

In each general formula, X, R, and n are the same as the general formula A. Q is a single bond or a hydrocarbon group, R<sub>2</sub> is the hydroxyl group, the thiol group, amino group, or carbonyl group combined with amino acid, and R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> are the bases of the following general formula C.

[Formula 3]



R<sub>5</sub> is the hydroxyl group, the thiol group, amino group, or carbonyl group combined with amino acid.

[Translation done.]

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2003-183298

(P2003-183298A)

(43) 公開日 平成15年7月3日 (2003. 7. 3)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-ロ-ド*(参考)
C 0 7 K 1/02	Z N A	C 0 7 K 1/02	Z N A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2001-385493(P2001-385493)

(22) 出願日 平成13年12月19日 (2001. 12. 19)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 千葉 一裕

東京都武蔵野市吉祥寺東町2-24-32

(72) 発明者 河野 悠介

東京都渋谷区本町3-48-8

(74) 代理人 100110168

弁理士 宮本 晴規

Fターム(参考) 4H045 A420 B410 FA30

(54) 【発明の名称】 相溶性-多相有機溶媒システムによりアミノ酸を逐次的に付加する液相ペプチド合成法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 固相反応ペプチド合成法に代替しうる液相ペプチド合成技術の提供

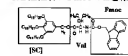
【解決手段】 温度を制御することにより相溶性の状態と相分離の状態とに可逆的に状態を制御できる溶媒システムを用いてペプチドを合成する。導入するアミノ酸残基を、前記溶媒システムを構成する一方の溶媒Aに対して溶解度を高める担体を用い、該合成すべきペプチドのC末端のアミノ酸残基を担体と結合したペプチド開始化合物およびこれに順次アミノ酸を導入する。他方の溶媒Bとして前記相溶性の状態を形成する温度以下においては前記ペプチド鎖の伸長に用いる種々のアミノ酸を優先的に溶解し、前記相溶性の状態を形成する温度以上では前記溶媒Aと相溶性状態の溶媒を形成して前記ペプチド開始化合物を溶解するものを用いて、種々の保護アミノ酸を溶解した前記溶媒Bを、相分離の状態において順次設計されたペプチドを合成するアミノ酸を溶解したものと置換し、加熱することにより、前記アミノ酸を順次結合させる。

可溶性担体を用いたペプチド鎖の伸長

可溶性担体



可溶性担体にFmoc-Valを結合



Fmoc-Glyを結合



Fmoc基を切断





## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 温度を制御することにより相溶性の状態と相分離の状態とに可逆的に状態を制御できる溶媒システムを用いてペプチドを合成する方法であって、合成すべきペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸残基を導入する残基として、前記状態を制御できる溶媒システムを構成する一方の溶媒または混合溶媒Aに対して溶解度を高める化合物から誘導される担体との組み合わせを用い、該溶媒または混合溶媒Aと該担体との組み合わせにより、該合成すべきペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸残基を担体と結合したペプチド開始化合物および前記ペプチド開始化合物に順次アミノ酸を導入してペプチド鎖を伸長した化合物を該溶媒または混合溶媒Aへの溶解度を高め、該溶媒または混合溶媒Aと組み合わせる他方の溶媒または混合溶媒Bとして、前記相溶性の状態を形成する温度以下においては前記ペプチド鎖の伸長に用いる種々のアミノ酸を優先的に溶解し、前記相溶性の状態を形成する温度以上では前記Aと相溶性状態の溶媒を形成して前記ペプチド開始化合物を溶解するものを用いて、種々のα位アミノ基に保護基を結合した保護アミノ酸を溶解した前記Bを、相分離の状態において順次設計されたペプチドを合成するアミノ酸を溶解したものと置換し、置換後相溶性状態を呈する温度に加熱することにより、前記アミノ酸を順次結合させることを特徴とする液相ペプチド合成法。

【請求項2】 一方の溶媒または混合溶媒Aが有機溶媒からなり、該溶媒または混合溶媒Aと組み合わせる他方の溶媒または混合溶媒Bも有機溶媒からなることを特徴とする請求項1に記載の液相ペプチド合成法。

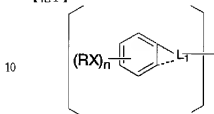
【請求項3】 一方の溶媒または混合溶媒Aを構成する有機溶媒がシクロアルカン系の化合物からなり、該溶媒または混合溶媒Aを構成する有機溶媒と組み合わせる他方の溶媒または混合溶媒Bを構成する有機溶媒がニトロアルカン、ニトリル、アルコール、ハロゲン化アルキル、アミド化合物およびスルホキサイドからなる群から選択される少なくとも一種から構成されたものであることを特徴とする請求項2に記載の液相ペプチド合成法。

【請求項4】 ニトロアルカンのアルキル基は炭素数が1、2または3であり、ニトリルのアルキル基の炭素数が1、2または3であり、アミド化合物はN-ジアルキルまたはN-モノアルキルアミドのアルキル基およびアシル基またはホルミル基の炭素数の合計は6以下であり、アルコールは炭素数が8以下であり、スルホキサイドのアルキル基は炭素数が1、2または3であり、またハロゲン化アルキルのアルキル基は炭素数が6以下であることを特徴とする請求項3に記載の液相ペプチド合成法。

【請求項5】 ペプチド開始化合物を形成する担体は、親シクロアルカン系溶媒部分とアミノ酸と結合する官能

基を有するものであることを特徴とする下記的一般式Aで表される芳香族炭化水素環または炭素数10以上の炭化水素基の基本骨格化合物からの残基からなることを特徴とする請求項1～4のいずれかに記載の液相ペプチド合成法。

## 【化1】

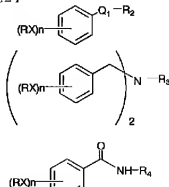


一般式A

〔一般式Aにおいて、 $L_1$ は、アミノ酸と結合する水酸基、チオール基、アミノ基、またはカルボニル基と結合する単結合、該水酸基、チオール基、アミノ基、またはカルボニル基と結合する原子団、または点線と結合して2環の縮合芳香族環を形成する原子団であり、点線はHと結合または前記 $L_1$ と結合して前記縮合芳香族環を形成する原子団であり、 $X$ はO、S、N、エステル基、スルフィド基またはイミノ基であり、 $R$ は、シクロアルカン系の溶剤への溶解性を高めるO、S、またはNを結合原子として含んでもよい炭素数10以上の炭化水素基である。 $n$ は1～5の整数である。〕また、前記炭素数10以上の炭化水素基が親シクロアルカン系溶媒への溶解性を高めるものである場合には、前記アミノ酸と結合する官能基を有する分枝鎖および/または置換基を有するものである。

【請求項6】 一般式Aで表される化合物が下記的一般式群Bから選択されるものであることを特徴とする請求項5に記載の液相ペプチド合成法。

## 【化2】



化合物群B

各一般式において、 $X$ 、 $R$ および $n$ は一般式Aと同じ。 $Q_1$ は、単結合または炭化水素基であり、 $R_2$ はアミノ酸と結合する水酸基、チオール基、アミノ基、またはカルボニル基であり、 $R_3$ および $R_4$ は、下記的一般式Cの基

である。

### 【化3】



一般式 C

R<sub>3</sub>は、アミノ酸と結合する水酸基、チオール基、アミノ基、またはカルボニル基である。

### 【発明の詳細な説明】

#### 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ペプチド、蛋白質、DNA、RNA、多糖類などオリゴマーまたはポリマー類、特にペプチドを、これらを構成する一種類または複数種類のユニット分子、特にアミノ酸を制御された順序で結合させて前記オリゴマーまたはポリマー類の合成法、特に液相ペプチド合成法に関する。特に設計されたオリゴマーまたはポリマー類、特にペプチドの合成の制御が容易であり、反応生成物の回収が容易である溶媒システムを用いた液相ペプチド合成法に関する。

#### 【0002】

【従来の技術】化学反応において、試薬、触媒、反応補助剤、副生成物などと、目的とする生成物を容易に分離することができれば、分離操作を大幅に低減させるだけでなく、工程で使用する薬剤を少なくすることができ、環境に有害な廃棄物を発生させることを極力抑制することができ、ところで、これまでに、ペプチドやDNAなどのオリゴマーおよびポリマー類は、それを設計に従って複数のユニット化合物を逐次変えながら結合させ伸長して合成されている。該合成には、固体表面に合成すべきオリゴマーおよびポリマー類を形成させる官能基、例えば、ペプチドの場合、不溶性樹脂表面にペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸残基を導入したものを溶媒中に分散させた状態でペプチド類を合成する固相合成法が用いられていた。しかしながら、この反応系においては、固体表面で化学反応を行わなければならないため、試薬が固体表面に接近にくく、一般に反応性、反応速度が低い、また、目的の反応が進行したことを簡便に確認することができないという問題があった。また、固相合成では反応スケールを大きくすることは困難であるとともに、固相担体の価格が高いものが多く、経済性の点でも問題があった。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明課題は、前記従来技術の、固相表面反応を液相反応としながら、得られた反応生成物の分離を極めて容易に実現する溶液ペプチド合成法を確立することである。前記課題点を解決すべく鋭意検討する中で、これまで本発明者らが開発した、温度を制御することにより相溶性の状態と相

離の状態とに可逆的に状態を制御できる溶媒システムを用いてペプチドを合成する方法を確立することを考えた。そのためには従来の固相反応ペプチド合成法におけるペプチドの形成を開始するアミノ酸単位の結合部を有し、アミノ酸単位を順次結合させ伸長させたペプチド鎖を担持する機能と、更に前記ペプチドの合成開始前のアミノ酸単位の結合部を有する化合物および合成中のペプチド鎖の結合した化合物を一方の溶媒または混合溶媒系に溶解させる機能を持つ化合物残基を見出す必要がある。本明細書では該化合物残基に要求される技術的特性から、担体と称する。そして、一方の溶媒または混合溶媒Aとして非極性有機溶媒からなるものを用い、前記Aと組み合わせる他方の溶媒または混合溶媒Bとして極性有機溶媒からなる溶媒システムと組み合わせる使用する担体として前記一般式Aの化合物を用いることにより前記固相反応ペプチド合成法に替った液相ペプチド合成法システムを確立し、前記課題を解決することができた。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】本発明は、温度を制御することにより相溶性の状態と相分離の状態とに可逆的に状態を制御できる溶媒システムを用いてペプチドを合成する方法において、合成すべきペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸残基を導入する残基として、前記状態を制御できる溶媒システムを構成する一方の溶媒または混合溶媒Aに対して溶解度を高める化合物から誘導される担体を用い、該溶媒または混合溶媒Aと該担体との組み合わせにより、該合成すべきペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸残基を担体と結合したペプチド開始化合物および前記ペプチド開始化合物に順次アミノ酸を導入してペプチド鎖を伸長した化合物を該溶媒または混合溶媒Aへの溶解度を高め、該溶媒または混合溶媒Aと組み合わせる他方の溶媒または混合溶媒Bとして、前記相溶性の状態を形成する温度以下においては前記ペプチド鎖の伸長に用いる種々のアミノ酸を優先的に溶解し、前記相溶性の状態を形成する温度以上では前記Aと相溶性状態の溶媒を形成して前記ペプチド開始化合物を溶解するものを用いて、種々のα位アミノ基に保護基を結合した保護アミノ酸を溶解した前記Bを、相分離の状態において順次設計されたペプチドを合成するアミノ酸を溶解したものと置換し、置換後相溶性状態を呈する温度に加熱することにより、前記アミノ酸を順次結合させることを特徴とする液相ペプチド合成法である。好ましくは、一方の溶媒または混合溶媒Aが有機溶媒からなり、該溶媒または混合溶媒Aと組み合わせる他方の溶媒または混合溶媒Bも有機溶媒からなることを特徴とする前記液相ペプチド合成法であり、より好ましくは、一方の溶媒または混合溶媒Aを構成する有機溶媒がシロアルカン系化合物からなり、該溶媒または混合溶媒Aを構成する有機溶媒と組み合わせる他方の溶媒または混合溶媒Bを構成する有機溶媒がニトロアルカン、ニトリル、アルコール、ハロ

ゲン化アルキル、アミド化合物およびスルホスルフォキシサイドからなる群から選択される少なくとも一種から構成されたものであることを特徴とする前記液相ペプチド合成法であり、一層好ましくは、ニトロアルカンのアルキル基は炭素数が1、2または3であり、ニトリルのアルキル基は炭素数が1、2または3であり、アミド化合物はN-ジアルキルまたはN-モノアルキルアミドのアルキル基およびアシル基またはホルミル基の炭素数の合計は6以下であり、アルコールは炭素数が8以下であり、スルホキシサイドのアルキル基は炭素数が1、2または3であり、またハロゲン化アルキルのアルキル基は炭素数が6以下であることを特徴とする前記液相ペプチド合成法であり、より一層好ましくは、ペプチド開始化合物を形成する担体は、親シクロアルカン系溶媒部分とアミノ酸と結合する官能基を有するものであることを特徴とする前記一般式Aで表される芳香族炭化水素環または炭素数10以上の炭化水素基の基本骨格化合物からの残基からなることを特徴とする前記の各液相ペプチド合成法であり、好ましくは前記化合物群Bで表されるものであることを特徴とする前記液相ペプチド合成法である。

【0005】従来の固相反応ペプチド合成法では、固相にアミノ酸結合基が存在するためアミノ酸との反応性悪く、過剰量のアミノ酸を反応系に供給することにより、固体表面における反応を完結しなければならぬという問題があった。しかし、本発明の液相ペプチド合成法では、ペプチド合成の反応は、相溶状態の均一溶液系で進行するため、反応効率が極めて高く、担体に結合したアミノ酸結合基に対して、外部から添加して反応させるためのアミノ酸分子の量は過剰量必要としない。

【0006】

【本発明の実施の態様】本発明をより詳細に説明する。A、本発明の溶媒システムは、少なくとも、わずかな温度変化により、可逆的に均一相溶混合溶媒系の状態と複数相に分離した分離溶媒系の状態とを取り得る二種以上の単一有機溶媒または混合有機溶媒から成り、かつ、一方の有機溶媒または混合有機溶媒は、分離溶媒系の状態においてペプチド開始化合物およびこれに順次アミノ酸を結合させ伸長したペプチド鎖を結合した化合物を溶解するが、前記結合させるアミノ酸を溶解せず、他方の有機溶媒または混合有機溶媒は、分離溶媒系の状態において前記結合させるアミノ酸を溶解するが、前記ペプチド開始化合物およびこれに順次アミノ酸を結合させ伸長したペプチド鎖を結合した化合物を溶解しない特性を持つことが基本である。

【0007】1、一方の単一有機溶媒または混合有機溶媒は、前記基本特性に基づいて選択されるが、基本的には低極性有機溶媒であり、該溶媒を構成する化合物群としては、アルカン、シクロアルカン、アルケン、アルキン、芳香族化合物などを挙げることができ、好ましいも

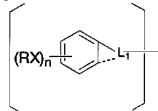
のとしては、シクロアルカン系の化合物を挙げる事ができ、特に好ましいものとしてシクロヘキサンを好ましいものとして挙げる事ができる。シクロヘキサンはイス型-1角形配座異性体の変換が他の溶媒との関連で温度的に比較的低極性な条件下で起こることに関連して、前記本発明の溶媒システムが実現されていることと推測することができる。シクロヘキサンは融点が6.5℃と比較的高く、反応後の生成物などは固化して分離でもという利点があり、この面からも好ましい溶媒と言うことができる。

【0008】2、前記1、と組み合わせる単一有機溶媒または混合有機溶媒としては、1、と同様に前記基本特性に基づいて選択されるが、基本的には、高極性有機溶媒である。好ましくは、ニトロアルカン、ニトリル、アルコール、ハロゲン化アルキル、アミド化合物およびスルホキシサイドからなる群から選択される。

【0009】3、前記溶媒システムと組み合わせる本発明の液相ペプチド合成法を確立するのはペプチド開始化合物に、分離溶媒系の状態において一方の単一の有機溶媒または混合有機溶媒に溶解性を高め、前記一方の単一の有機溶媒または混合有機溶媒と組み合わせる他方の単一の有機溶媒または混合有機溶媒に溶解しないものを選択することが重要であり、このようなものとして下記一般式Aで表される残基および炭素数10以上の炭化水素基の基本骨格化合物からの残基から選択される。

【0010】

【化4】

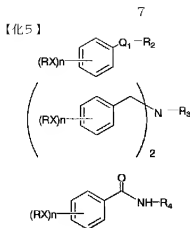


一般式A

【0011】一般式Aにおいて、L1は、アミノ酸と結合する水酸基、チオール基、アミノ基、またはカルボニル基と結合する単結合、該水酸基、チオール基、アミノ基、またはカルボニル基と結合する原子団、または点線と結合して2環の縮合芳香族環を形成する原子団であり、点線はHとの結合または前記L1と結合して前記縮合芳香族環を形成する原子団であり、XはO、S、N、エステル基、スルフィド基またはイミノ基であり、Rは、シクロアルカン系の溶剤への溶解性を高めるO、S、またはNを結合原子として含んでいても良い炭素数10以上の炭化水素基である。nは1~5の整数である。

【0012】前記一般式Aの具体例としては、下記の一般式群Bの化合物を挙げる事ができる。

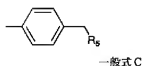
【0013】



【0014】各一般式において、X、Rおよびnは一般式Aと同じ。Qは、単結合または炭化水素基であり、R<sub>2</sub>はアミノ酸と結合する水酸基、チオール基、アミノ基、またはカルボニル基であり、R<sub>3</sub>およびR<sub>4</sub>は、下記的一般式Cの基である。

【0015】

【化6】



【0016】R<sub>5</sub>は、アミノ酸と結合する水酸基、チオール基、アミノ基、またはカルボニル基である。

【0017】4、本発明の液相ペプチド合成法に用いられるアミノ酸は、従来の固相反応ペプチド合成法に用いられる保護アミノ酸、例えば、Fmoc（9-フルオレニルメトキシカルボニル）-アミノ酸、Boc（tert-ボトキシカルボニル）-アミノ酸、Cbz（ベンジルオキシカルボニル）-アミノ酸などを組み合わせることができる。

【0018】ここでは、更に具体的な例を実施例として示すが、これは本発明をより理解し易くするためのものであり、本発明を限定するものではない。

【0019】実施例1

可溶性担体〔SC〕-バリン（Val）-グリシン（Gly）-フェニルアラニン（Phe）-Fmoc〔（SC）-Val-Gly-Phe-Fmoc〕の液相合成。

可溶性担体〔SC〕として、一般式群Bにおいて、RがC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>-であり、XがOであり、nが3であり、QがCH<sub>2</sub>であり、R<sub>2</sub>がOHである、（3,4,5-トリオクタデシルオキシフェニル）メタン-1-オール、〔（3,4,5-trioctadecyloxyphenyl）methan-1-ol〕を用いる。

【0020】工程1）Fmoc-Val（170mg）をジクロロメタン3mLに溶解し、さらにジクロロヘキ

8

サルカルボジミド（DCC）125mgを添加する。本溶液を室温にて15分間攪拌した後、ろ過、ろ液をロータリーエバポレーターで濃縮乾固した後、得られた残渣をジメチルホルムアミド（DMF）3mLに溶解する。続いて可溶性担体〔SC〕を溶解したシクロヘキサン溶液（可溶性担体50mg/3mL）3mLをDMF溶液に添加する。さらに4-ジメチルアミノピリジン（DMAP）6.5mgを添加し、反応溶液を50℃に加熱し、30分反応を行う。このときシクロヘキサン層とDMF層に分離していた溶液系は均一溶液系になる。反応終了後、反応溶液を室温に戻し、反応溶液を再び二相に分離させる。下層のDMF相を分離、除去し、10%ジエチルアミン/DMF溶液を3mL添加し、50℃で20分間攪拌する。反応液を冷却し、シクロヘキサン層を分離する。このシクロヘキサン層には可溶性担体結合バリン-NH<sub>2</sub>〔（SC）-Val-NH<sub>2</sub>〕が回収される。（収率95%）

【0021】工程2）Fmoc-Gly57mg、HOBt55mg、ジソプロピルカルボジミド（DIPC）25mgをDMF2mLに溶解し、150分間室温で攪拌する。この溶液を活性化したFmoc-グリシン-OH/DMF溶液として用いる。すなわち、この溶液2mLを5℃に冷却後、工程1）で得た〔SC〕-Val-NH<sub>2</sub>/シクロヘキサン溶液（2mL）を添加する。反応液は5℃から50℃まで一時間かけて穏やかに上昇させ、さらに50℃で30分放置する。最後に、反応液を室温まで冷却すると、再び2層に分離するので、上層〔シクロヘキサン層〕から目的の生成物〔SC〕-Val-Gly-Fmocを分離する。Fmoc基は同溶液にジエチルアミンを添加することにより、脱離し〔SC〕-Val-Gly-NH<sub>2</sub>を得る。図1に、この合成反応の概略を示す。

【0022】工程3）つぎに、Fmoc-Phe57mg、HOBt55mg、ジソプロピルカルボジミド（DIPC）25mgをDMF2mLに溶解し、150分間室温で攪拌する。この溶液を活性化したFmoc-フェニルアラニン（Phe）-OH/DMF溶液として用いる。すなわち、この溶液2mLを5℃に冷却後工程2）で得た〔SC〕-Val-Gly-NH<sub>2</sub>/シクロヘキサン溶液（2mL）を添加する。反応液は5℃から50℃まで一時間かけて穏やかに上昇させ、さらに50℃で30分放置する。最後に、反応液を室温まで冷却すると、再び2層に分離するので、上層〔シクロヘキサン層〕から目的の生成物〔SC〕-Val-Gly-Phe-Fmocを分離する。以上の操作を繰り返すことにより、可溶性担体に逐次アミノ酸を結合させ、目的とするオリゴペプチドが合成される。

【0023】構造確認

〔SC〕シクロヘキサン可溶性担体；（3,4,5-トリオクタデシルオキシフェニル）メタン-1-オール

[(3,4,5-triiododecylphenyl)methanol]。  
<sup>1</sup>H-NMR (400MHz) δ: 5.54 (2H, s), 4.58 (2H, d, J=5.1 Hz), 3.96 (4H, t, J=6.6 Hz), 3.96 (3H, s), 1.82-1.70 (6H, m), 1.50-1.41 (6H, m), 1.38-1.20 (84H, br), 0.88 (9H, 6.8 Hz), <sup>13</sup>C-NMR (100Hz): (100MHz) δ: 153.2, 137.4, 136.0, 105.2, 73.4, 69.1, 65.7, 32.0, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 26.2, 22.8, 14.2; MALDI TOF-MS (pos) C<sub>61</sub>H<sub>116</sub>O<sub>3</sub>に対する計算値 [M+Na]<sup>+</sup>935, 実験値935。

【0024】[SC]-Val-Fmoc  
<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 7.76 (2H, d, J=7.7 Hz), 7.60 (2H, d, J=7.7 Hz), 7.40 (2H, dt, J=2.6, 7.3 Hz), 7.31 (2H, t, J=7.3 Hz), 6.5 (3H, s), 5.31 (1H, d, J=9.2 Hz), 5.11 (1H, d, J=12.1 Hz), 5.05 (1H, d, J=12.1 Hz), 4.38 (2H, m), 4.23 (1H, t, J=7.3 Hz), 3.94 (6H, m), 2.19 (1H, m), 1.78 (4H, m), 1.73 (2H, m), 1.45 (6H, m), 1.35-1.23 (84H, br), 0.95 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.88 (12H, m), <sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ: 172.0, 156.2, 153.2, 143.9, 143.8, 141.3, 138.4, 130.2, 128.3, 127.7, 127.1, 125.1, 120.0, 107.1, 73.4, 69.2, 67.4, 67.1, 59.0, 47.2, 32.0, 31.4, 30.3, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.1, 1.3, 2.7, 14.1; TOF-MS (pos) MF, C<sub>91</sub>H<sub>138</sub>NO<sub>7</sub> [M+Na]<sup>+</sup>に対する計算値1257, 実験値1257

【0025】[SC]-Val-NH<sub>2</sub>  
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) δ: 6.54 (2H, s), 5.07 (1H, d, J=12.1 Hz), 5.03 (1H, d, J=12.1 Hz), 3.95 (4H, t, J=6.6 Hz), 3.94 (2H, t, J=6.6 Hz), 3.33 (2H, d, J=5.1 Hz), 2.07-2.01 (1H, m), 1.81-1.77 (4H, m), 1.76-1.71 (2H, m), 1.49-1.43 (6H, m), 1.37-1.23 (84H, br), 0.96 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.89-0.86 (12H, m), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) δ: 175.4, 153.2, 138.3, 130.7, 107.1, 73.4, 69.2, 66.8, 59.9, 32.

2, 32.0, 30.3, 29.8, 29.7, 29.6, 29.4, 26.1, 22.7, 19.3, 17.1, 14.1; TOF-MS (pos) C<sub>66</sub>H<sub>125</sub>NO<sub>5</sub> [M+Na]<sup>+</sup>に対する計算値1034, 実験値1034

【0026】[SC]-Val-Gly-Fmoc  
<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz) δ: 7.77 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.59 (2H, d, J=7.3 Hz), 7.40 (2H, t, J=7.3 Hz), 7.31 (2H, dt, J=0.7, 7.3 Hz), 6.52 (2H, s), 6.38 (1H, d, J=8.4 Hz), 5.44-5.37 (1H, br), 5.10 (1H, d, J=12.1 Hz), 5.02 (1H, d, J=12.1 Hz), 4.62 (2H, dd, J=8.4, 4.8 Hz), 4.42 (2H, d, J=7.0 Hz), 4.24 (1H, t, J=7.0 Hz), 3.96-3.92 (8H, m), 2.21-2.16 (1H, m), 1.81-1.76 (4H, m), 1.75-1.70 (2H, m), 1.48-1.43 (6H, m), 1.37-1.21 (84H, br), 0.91 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.88 (9H, t, J=7.0 Hz), 0.86 (3H, d, J=7.0 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) δ: 171.5, 168.7, 156.5, 153.1, 143.6, 141.2, 138.3, 130.0, 127.7, 127.0, 125.0, 120.0, 107.0, 73.4, 69.2, 67.5, 67.4, 57.1, 47.1, 32.0, 31.4, 30.4, 29.8, 29.7, 29.5, 29.4, 26.1, 22.8, 19.0, 17.7, 14.2; MALDI TOF-MS (pos) C<sub>88</sub>H<sub>138</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub> [M+Na]<sup>+</sup>に対する計算値1314, 実験値1314

【0027】[SC]-Val-Gly-NH<sub>2</sub>  
<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz) δ: 7.74 (1H, d, J=9.2 Hz), 6.53 (2H, s), 5.11 (1H, d, J=12.1 Hz), 5.02 (1H, d, J=12.1 Hz), 4.61 (1H, d, J=9.2, 5.1 Hz), 3.95 (4H, t, J=6.6 Hz), 3.94 (2H, t, J=6.6 Hz), 3.39 (2H, s), 2.24-2.18 (1H, m), 1.81-1.76 (4H, m), 1.75-1.71 (2H, m), 1.49-1.44 (6H, m), 1.37-1.20 (84H, br), 0.93 (3H, d, J=7.0 Hz), 0.90-0.86 (12H, m), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz) δ: 172.6, 171.8, 153.1, 130.3, 125.5, 106.9, 73.4, 69.2, 67.2, 56.6, 44.8, 32.0, 31.3, 30.4, 30.3, 29.8, 29.

11

7. 29. 5, 29. 4, 26. 2, 22. 8, 19. 1, 17. 8, 14. 2; MALDI TOF-MS (p o s)  $C_{89}H_{128}N_2O_6$  (M+Na)<sup>+</sup>に対する計算値1091、実験値1091

【0028】[SC] -Val-Gly-Phe-Fmoc

<sup>1</sup>H-NMR (600 MHz)  $\delta$ : 7. 75 (2H, d, J=7. 7 Hz), 7. 53-7. 49 (2H, m), 7. 39 (2H, dd, J=7. 3, 2. 2 Hz), 7. 30-7. 27 (4H, m), 7. 25-7. 21 (1H, m), 7. 20-7. 15 (2H, b r), 6. 76-6. 69 (1H, br), 6. 60-6. 55 (1H, br), 6. 50 (2H, s), 5. 40-5. 34 (1H, br), 5. 07 (1H, d, J=12. 1 Hz), 4. 99 (1H, d, J=2. 1 Hz), 4. 56 (1H, dd, J=8. 8, 8. 8 Hz), 4. 46-4. 30 (2H, m), 4. 17 (1H, t, J=7. 0 Hz), 4. 10-4. 03 (1H, m), 3. 92 (6H, t, J=6. 6 Hz), 3. 83-3. 76 (2H, m), 3. 18-3. 11 (1H, m), 3. 10-3. 02 (1H, m), 2. 20-2. 13 (1H, m), 1. 79-1. 69 (6H, m), 1. 48-1. 41 (6H, m), 1. 35-1. 23 (84H, br. m), 0. 91-0. 85 (15H, m); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz)  $\delta$ : 171. 5, 171. 3, 168. 3, 156. 0, 153. 1, 143. 6, 141. 2, 138. 2, 136. 2, 130. 1, 129. 1, 128. 8, 127. 7, 127. 1, 127. 0, 125. 0, 124. 9, 120. 0, 107. 0, 73. 4, 69. 2, 67. 5, 67. 1, 57. 3, 47. 2, 32. 0, 31. 3, 30. 4, 29. 8, 29. 7, 29. 5, 29. 4, 26. 2, 22. 8, 19. 0, 17. 8, 14. 2; MALDI TOF-MS (p o s)  $C_{91}H_{147}N_3O_9$  (M+Na)<sup>+</sup>に対する計算値1461、実験値1461

【0029】[SC] -Val-Gly-Phe-NH<sub>2</sub>

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz)  $\delta$ : 7. 99-7. 93 (1H, m), 7. 35-7. 30 (2H, m), 7. 27-7. 21 (3H, m), 6. 66 (1H, d, J=8. 8 Hz), 6. 52 (2H, s), 5. 11 (1H, d, J=12. 1), 5. 02 (1H, d, J=12. 1 Hz), 4. 58 (1H, dd, J=8. 8, 4. 8 Hz), 4. 05 (1H, d, J=5. 9 Hz, minor), 4. 01 (1H, d, J=5. 9 Hz, major), 3. 98-3. 91 (7H, m), 3. 66 (1H, d, J=10. 0 Hz), 3. 32 (1H, dd, J=6. 6, 3. 9 Hz), 2. 67 (1H, dd, J=13. 6, 10. 0 Hz), 2. 24-2. 15 (1H, m), 1. 82-1. 69 (6H, m), 1. 50-1. 39 (6H, m), 1. 37

12

-1. 21 (84H, br), 0. 92 (3H, d, J=6. 8 Hz), 0. 90-0. 85 (12H, m); <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz)  $\delta$ : 175. 2, 171. 5, 168. 9, 153. 1, 151. 4, 137. 7, 129. 2, 128. 8, 126. 9, 125. 5, 107. 0, 73. 5, 69. 2, 67. 5, 57. 2, 56. 5, 43. 4, 40. 9, 32. 0, 31. 3, 30. 4, 29. 8, 29. 7, 29. 5, 29. 4, 26. 2, 22. 8, 19. 1, 17. 7, 14. 2; MALDI TOF-MS (p o s)  $C_{77}H_{137}N_3O_7$  (M+Na)<sup>+</sup>に対する計算値1239、実験値1239

【0030】実施例2

[SC] -バリン-フェニルアラニン-Fmoc ([SC] -Val-Phe-Fmoc) の液相合成

Fmoc-Phe 63 mg、HOBt 63 mg、ジソプロピルカルボジミド (DIPCD) 25 mg を DMF 2 mL に溶解し、150 分間室温で攪拌する。この溶液を活性化し

た Fmoc-Phe / DMF 溶液として用いる。すなわち、この溶

液 2 mL を 5℃ に冷却後、実施例 1 の工程 1) で得た

[SC] -Val-NH<sub>2</sub> / シクロヘキサン溶液 (2 mL) を添加する。反応液は 5℃ から 50℃ まで一時間かけて穏やかに上昇させ、さらに 50℃ で 30 分放置する。最後に、反応液を室温まで冷却すると、再び 2 層に分離するので、上層 (シクロヘキサン層) から目的の生成物 [SC] -Val-Phe-Fmoc を分離する。以上の操作を繰り返すことにより、可溶性担体に逐次アミノ酸を結合させ、目的とするペプチドが合成される。

【0031】実施例3

30 [SC] -バリン-プロリン-Fmoc ([SC] -Val-Pro-Fmoc) の液相合成

Fmoc-Pro 53 mg、HOBt 57 mg、ジソプロピルカルボジミド (DIPCD) 25 mg を DMF 2 mL に溶解し、150 分間室温で攪拌する。この溶液を活性化し Fmoc-P

ro-OH / DMF 溶液として用いる。すなわち、この溶液 2 mL を 5℃ に冷却後、実施例 1 の 1) で得た [SC] -Val-NH<sub>2</sub> / シクロヘキサン溶液 (2 mL) を添加する。反応液は 5℃ から 50℃ まで一時間かけて穏やかに上昇させ、さらに 50℃ で 30 分放置する。最後に、反応液

を室温まで冷却すると、再び 2 層に分離するので、上層

(シクロヘキサン層) から目的の生成物 [SC] -Val-Pro-Fmoc を分離する。以上の操作を繰り返すことにより、可溶性担体に逐次アミノ酸を結合させ、目的とする

ペプチドが合成される。  
【0032】実施例4  
可溶性担体-バリン-アラニン-Fmoc ([SC] -Val-Ala-Fmoc) の液相合成  
Fmoc-Ala 50 mg、HOBt 53 mg、ジソプロピルカルボジミド (DIPCD) 25 mg を DMF 2 mL に溶解し、150 分間室温で攪拌する。この溶液を活性化し

Fmoc-Ala-OH/DMF溶液として用いる。すなわち、この溶液2 mLを5℃に冷却後、実施例1の工程1)で得た[SC]-Val-NH<sub>2</sub>/シクロヘキサン溶液(2 mL)を添加する。反応液は5℃から50℃まで一時間かけて穏やかに上昇させ、さらに50℃で30分放置する。最後に、反応液を室温まで冷却すると、再び2層に分離するので、上層(シクロヘキサン層)から目的の生成物([SC]-Val-Ala-Fmoc)を分離する。以上の操作を繰り返すことにより、可溶性担体に逐次アミノ酸を結合させ、目的とするペプチドが合成される。

【0033】

【発明の効果】以上述べたように、本発明の方法により、合成すべきペプチドのカルボキシ末端のアミノ酸残基を導入した化合物として、それ自身およびペプチドを結合した化合物を反応溶媒システムを構成する一方の溶媒に可溶にする担体と組み合わせることにより、固相反応ペプチド合成に比べて、制御が容易であり、かつ、反応生成物の回収が容易である液相ペプチド合成法が提供されるという、優れた効果がもたらされる。

【図面の簡単な説明】

10 【図1】 本発明の液相ペプチド合成法の一態様の概略

【図1】

